

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Natálie Kroftová

Srovnání účinnosti cytochromů P450 exprimovaných
v prokaryotickém a eukaryotickém systému

The comparison of the efficiency of cytochromes P450 expressed
in prokaryotic and eukaryotic systems

Bakalářská práce

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. května 2011

.....
Natálie Kroftová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení a za laskavý a trpělivý přístup při vypracovávání této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Radku Indrovi za všestrannou pomoc, potřebné rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Můj dík patří rovněž Mgr. Šárce Blažkové za věcné připomínky a nápady a mé rodině za podporu při psaní i během celého studia.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

Abstrakt v českém jazyce

Nádorové onemocnění je skupina klinicky rozdílných onemocnění charakterizovaných neregulovaným množením nádorových buněk neschopných diferenciace. Léčba nádorů spočívá v kombinaci chirurgického zákroku, radioterapie a chemoterapie cytostatickými léčivými. Do skupiny cytostatik se řadí i rostlinný alkaloid ellipticin. Účinkuje prostřednictvím interkalace do DNA, jako inhibitor topoisomerasy II a tvoří kovalentní adukty s DNA. Prostřednictvím enzymové katalýzy cytochromy P450 je ellipticin oxidován na detoxifikační metabolity 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin a na aktivační metabolity 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu. Cílem praktické části bakalářské práce bylo srovnání účinnosti lidských cytochromů P450 1A1/2 a 3A4 exprimovaných v prokaryotickém a eukaryotickém systému v oxidaci ellipticinu. Metabolity ellipticinu byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Bylo zjištěno, že cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému katalyzuje nejvíce tvorbu 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu. Rozdíl v produkci metabolitů ellipticinu katalyzované cytochromem P450 1A2 exprimovaným v obou systémech je minimální. Tvorba 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu, metabolitů tvořících kovalentní adukty s DNA, je katalyzována převážně cytochromem P450 3A4 exprimovaným v prokaryotickém systému. Výsledky této práce ukazují, že lidské cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 exprimované v prokaryotickém systému katalyzují oxidaci ellipticinu efektivněji než tytéž cytochromy P450 exprimované v eukaryotickém systému.

Klíčová slova:

protinádorová chemoterapie, ellipticin, kovalentní adukty s DNA, cytochrom P450, oxidace, prokaryotický a eukaryotický systém

Abstrakt v anglickém jazyce

Cancer disease is a group of clinically diverse diseases characterized by uncontrolled proliferation of cancer cells incapable of differentiation. Tumor therapy consists of a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy utilizing cytostatic agents. The plant alkaloid ellipticine ranks among a group of cytostatic agents. Its mode of action is based on DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II and formation of covalent DNA adducts. Ellipticine is oxidized through cytochromes P450 catalysis into detoxication metabolites 9-hydroxyellipticine and 7-hydroxyellipticine, and into activation metabolites 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide. The aim of practical part of this work was to compare the efficiency of human cytochromes P450 1A1/2 and 3A4 expressed in prokaryotic and eukaryotic systems in the process of ellipticine oxidation. Ellipticine metabolites were analysed using high performance liquid chromatography. It was found that cytochrome P450 1A1 expressed in the prokaryotic system catalyses predominantly the formation of 9-hydroxyellipticine and 7-hydroxyellipticine. The difference is minimal in the production of ellipticine metabolites catalysed by cytochromes P450 1A2 expressed in both cellular systems. The formation of 13-hydroxyellipticine and 12-hydroxyellipticine, the metabolites generating covalent DNA adducts, is catalysed predominantly by cytochrome P450 3A4 expressed in the prokaryotic system. The results found in this work show that human cytochromes P450 1A1/2 and 3A4 expressed in the prokaryotic system catalyse ellipticine oxidation more efficiently than the same cytochromes P450 expressed in the eukaryotic system.

Key words:

anti-tumor chemotherapy, ellipticine, covalent DNA adducts, cytochrome P450, oxidation, prokaryotic and eukaryotic systems

(In Czech)

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	10
1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	10
1.1.1 Podstata kancerogeneze.....	11
1.1.2 Kancerogenní faktory.....	11
1.1.3 Základní fáze kancerogeneze	12
1.2 LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	13
1.2.1 Chemoterapie nádorových onemocnění.....	14
1.2.2 Farmakokinetika protinádorových léčiv	14
1.2.3 Mechanismus účinku protinádorových léčiv.....	15
1.3 ELLIPTICIN.....	16
1.3.1 Biotransformace ellipticinu.....	16
1.3.2 Mechanismy protinádorového působení ellipticinu	17
1.3.3 Tvorba kovalentních aduktů s DNA	18
1.4 SYSTÉM MONOOXYGENAS SE SMÍŠENOU FUNKCÍ.....	19
1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa	20
1.4.2 Cytochromy P450.....	21
1.4.3 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce.....	23
1.5 CYTOCHROM B ₅	25
1.5.1 Mechanismy působení cytochromu b ₅	25
1.5.2 Vliv cytochromu b ₅ na reakce katalyzované cytochromy P450.....	26
2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	27
3 MATERIÁL A METODY	28
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	28
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	29
3.3 METODY	30
3.3.1 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému.....	30
3.3.2 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému za přítomnosti cytochromu b ₅	30
3.3.3 Separace metabolitů ellipticinu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií	31

4	VÝSLEDKY	33
4.1	OXIDACE ELLIPTICINU LIDSKÝMI CYTOCHROMY P450 1A1, 1A2 A 3A4 EXPRIMOVANÝMI V PROKARYOTICKÉM A EUKARYOTICKÉM SYSTÉMU	33
4.1.1	<i>Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1</i>	33
4.1.2	<i>Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2</i>	34
4.1.3	<i>Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4</i>	35
4.2	OXIDACE ELLIPTICINU LIDSKÝMI CYTOCHROMY P450 1A1, 1A2 A 3A4 EXPRIMOVANÝMI V PROKARYOTICKÉM A EUKARYOTICKÉM SYSTÉMU - SROVNÁNÍ EFEKTIVITY JEDNOTLIVÝCH IZOENZYMŮ	37
4.2.1	<i>Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v eukaryotickém systému</i>	37
4.2.2	<i>Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i>	38
4.2.3	<i>Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reduktasy</i>	39
5	DISKUZE	40
6	ZÁVĚR	42
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
cyt b ₅	cytochrom b ₅
Da	dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	číselný kód enzymu
FAD, FADH, FADH ₂	flavinadeninukleotid oxidovaný, radikálový, redukovaný
FMN, FMNH, FMNH ₂	flavinmononukleotid oxidovaný, radikálový, redukovaný
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
IARC	Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
LR	nižší hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy
M	mol/l
M1 - M5	metabolity ellipticinu
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (Mixed Function Oxidases)
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
NAD ⁺ , NADH	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný, redukovaný
NADP ⁺ , NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný, redukovaný
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
R	vyšší hladina NADPH:cytochrom P450 reduktasy
R'OH	alkohol vzniklý redukcí organického hydroperoxidu
R'OOH	organický hydroperoxid
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)
RPM	počet otáček za minutu
RTG	rentgenovo záření
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
U	standardní jednotka enzymové aktivity
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

1 ÚVOD

Nádorová onemocnění se vzhledem ke stárnutí populace a nedostatečnému důrazu na prevenci stávají stále významnějším zdravotním, sociálním a ekonomickým problémem, který je nutné co nejrychleji a nejefektivněji řešit.

Výskyt nádorových onemocnění celosvětově vzrůstá. V České republice rakovinou ročně onemocní více než 76 000 osob a 27 000 z nich tomuto zákeřnému onemocnění podlehnou. Ze statistických pozorování vyplývá, že se počet nově zjištěných případů nádorových onemocnění každoročně zvýší o 6 %, zatímco úmrtnost na tato onemocnění již vykazuje trvale klesající trend (o 2 % za rok). Podle odborníků je rostoucí incidence některých nádorů ovlivněna hlavně prodlužujícím se věkem obyvatel a dále pak časnější diagnostikou těchto onemocnění. Klesající míra úmrtnosti následně vypovídá o zlepšující se kvalitě lékařské péče a strategické organizaci protinádorové léčby [30].

Během svého života u nás onemocní jednou z forem rakoviny každý třetí obyvatel a každý čtvrtý na ni zemře. Je to druhá nejčastější příčina úmrtí po kardiovaskulárních onemocněních u dospělých a druhá příčina úmrtí u dětí, která následuje za úrazy [8]. Mezi nejčastěji diagnostikované zhoubné novotvary pak patří kolorektální karcinom, zhoubný nádor průdušnice a plic, karcinom prsu u žen a nádory prostaty u mužů [30].

Uvedené údaje naznačují, že je třeba se nadále problematikou nádorových onemocnění intenzivně zabývat a léčit pacienty v souladu s postupy racionální medicíny. Ta představuje kombinaci chirurgického zákroku, chemoterapie a radioterapie.

1.1 Nádorová onemocnění

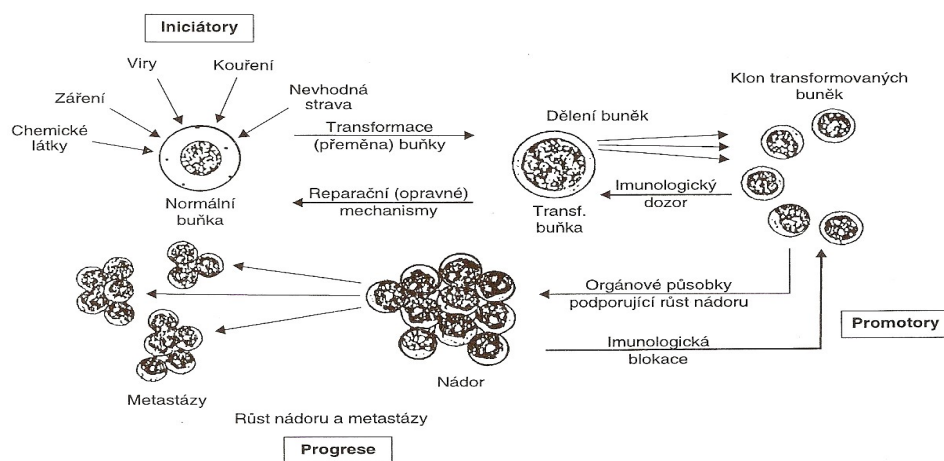
Nádorové onemocnění neboli rakovina je chorobný stav charakterizovaný nekontrolovatelným růstem abnormálních buněk. Růst masy rakovinných buněk probíhá autonomně bez projevů regulačních zásahů organismu a na úkor energetických a nutričních potřeb jeho normálních buněk. Rakovinu nelze chápat jako jedinou chorobnou jednotku, ale jako skupinu onemocnění s rozdílným klinickým průběhem [36].

Nádory se dle svého biologického chování dělí na nezhoubné (benigní) a zhoubné (maligní) [36]. Benigní nádory se vyznačují ohraničeným růstem v místě svého vzniku. Buňky těchto nádorů zpravidla nepronikají do okolních tkání a nemetastazují. Na rozdíl od maligních nádorů jsou benigní nádory většinou dobře chirurgicky odstranitelné bez hrozící recidivy. Maligní nádor je oproti benignímu charakterizován rychlým agresivním

růstem. Maligní buňky se šíří do okolních tkání, vrůstají do buněk těchto tkání, které tím ničí, a zakládají vzdálená ložiska (metastázy). Právě schopnost metastazovat je základním znakem malignity nádorových onemocnění [60].

1.1.1 Podstata kancerogeneze

Kancerogeneze je postupný mnohastupňový proces, při kterém dochází ke kumulaci poruch (mutací) určitých genů. Hromadění genových mutací vede k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů, zejména těch, které se podílejí na regulaci dělení a diferenciace buňky [14]. Vznik určitých mutací v několika kritických genech pak může vést k transformaci zdravé buňky v buňku maligní (Obrázek č. 1), následované vznikem nádoru (tumoru). Pro kancerogenezi jsou významné poruchy jen poměrně malého počtu genů. Jejich počet se odhaduje na několik set, což je méně než 0,1 % z celého genomu [58].



Obrázek č. 1 Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze [8].

1.1.2 Kancerogenní faktory

Riziko vzniku mutací výše uvedených genů, a tím i nádorových onemocnění stoupá působením faktorů s mutagenními účinky. Mezi tyto faktory, zvané též kancerogenní, se řadí vnitřní faktory (dědičné dispozice) a faktory zevního prostředí, které se podle svých vlastností dělí na fyzikální, biologické a chemické [36]. Zatímco v rozvojových zemích se na vzniku nádorů nejvíce podílejí infekce, ve vyspělých státech jsou to hlavně dietetické návyky, nadužívání alkoholu a tabákových výrobků [58].

Mezi fyzikální faktory patří především záření, a to jak ionizující (RTG záření), tak i neionizující (UV záření). Kancerogenní účinek těchto záření je vázán na poškození DNA za vzniku jedno- a dvouřetězcových zlomů. Spojitost mezi expozicí RTG či UV záření a vznikem nádorů byla potvrzena pro kožní karcinom a pigmentový nádor (melanom) [36].

V současné době se odhaduje, že 15 až 20 % případů nádorových onemocnění je způsobeno onkoviry [45]. Tento vztah je jednoznačně prokázán pro lidský papilomavirus ve spojitosti se vznikem karcinomu děložního čípku či pro virus hepatitidy B v souvislosti se zvýšeným výskytem hepatocelulárního karcinomu [36].

Do chemických faktorů se řadí kancerogeny syntetické i kancerogeny přírodního původu [53]. Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (IARC) bylo označeno již 107 látek za kancerogeny vyvolávající nádorová onemocnění u člověka [1]. Za nejzávažnější skupiny jsou považovány především polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, nitrosaminy či chlorované uhlovodíky [36]. Podle mechanismu působení se dělí na genotoxické kancerogeny, které se váží na DNA kovalentní vazbou za vzniku aduktů. Druhou skupinu tvoří kancerogeny způsobující změny struktury DNA, jako jsou jedno- a dvouřetězcové zlomy a „cross-linking“ (propojení molekul). Třetí skupinou jsou faktory epigenetické, které modifikují DNA nekovalentními vazbami, například interkalací do její dvoušroubovicové struktury [53].

Výše uvedené kancerogenní faktory působí většinou v malých množstvích, v různých kombinacích a po dlouhou dobu, než iniciují kancerogenezi. Jejich účinek se vzájemně sčítá nebo násobí [58]. Podle odhadů by úmrtnost na nádorová onemocnění bylo možné snížit až o 33 %, a to úpravou životního stylu a omezením expozice k vnějším kancerogenním faktorům [36].

1.1.3 Základní fáze kancerogeneze

Proces vzniku a vývoje nádorového onemocnění probíhá v níže popsaných třech hlavních fázích:

V iniciační fázi dochází ve zdravé buňce, na kterou působí kancerogenní faktory - iniciátory, k indukovaným mutacím v kritických genech v DNA. V menší míře vznikají mutace v genech i spontánně. Mutací se aktivují onkogeny a deaktivují tumor supresorové geny (antionkogeny). Jinými slovy poškozením těchto genů, kódujících proteiny, které regulují buněčné dělení, a selháním reparačních mechanismů dochází k transformaci zdravé buňky v buňku nádorovou. Navíc mutací v genech regulujících apoptózu buňka

ztratí schopnost aktivovat sebedestrukční program (apoptózu). Pokud nezasáhne imunologický „dozor“, dochází k vývoji klonu nádorových buněk [36, 45].

Ve fázi promoce, která může trvat několik let až desetiletí, se zvyšuje proliferace klonu nádorových buněk s porušenou diferenciací a vzniká benigní nádor. Zároveň se působením promotorů prohlubují již existující genetické změny. Zmíněné promoční faktory mají negenotoxické vlastnosti, jejich účinek se proto může projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Zvláště proteiny onkogenů exprimované po jejich aktivaci či redoxními reakcemi vzniklé aktivní formy kyslíku v kombinaci se selháním kontrolního mechanismu imunitního systému urychlují růst nádoru [36, 53].

V poslední fázi kancerogeneze, progresi, se působením progresorů, látek s genotoxickým účinkem, mění dosud částečně kontrolovaný růst benigního nádoru na růst nekontrolovatelný. Vzniká nádor maligní, který invazivně vrůstá do okolních tkání. Jeho odštěpené buňky se mohou šířit lymfogenní nebo hematogenní cestou do jiných tkání či orgánů a založit tam vzdálená ložiska - metastáze. Podmínkou nádorového růstu je dostatečný přívod živin, který je zajištěn nádorovou neoangiogenezí, vytvořením cévního zásobení [36, 45].

1.2 Léčba nádorových onemocnění

Léčba nádorových onemocnění se v dnešní době sestává z postupné i současné kombinace chirurgického zákroku, radiační terapie, chemoterapie a podpůrné léčby, jejíž význam neustále narůstá. Cíl této kombinované léčby je zaprvé kurativní čili vyléčení pacienta, přesněji řečeno prodloužení celkové doby jeho přežití i za cenu zhoršení kvality života vlivem léčby. Další léčba, paliativní, si neklade za cíl pacienta vyléčit, ale prodloužit jeho život společně se zlepšením jeho kvality. Těžiště protinádorové terapie zatím bohužel leží na paliaci. Za symptomatickou neboli podpůrnou se pak považuje léčba, která zlepšuje kvalitu pacientova života mírněním potíží vyvolaných přímo nádorem či samotnou léčbou [36, 60].

V současné době jsou vyvíjena nová léčiva (monoklonální protilátky a léčiva o malé molekulové hmotnosti tzv. „small drugs“), která zasahují cíleně do klíčových mechanismů kancerogeneze. Tato „cílená terapie“ (z angl. targeted therapy) si klade za úkol zasáhnout určitý protein s cílem maximálního poškození nádorových buněk za vzniku minimálních nežádoucích účinků [23]. Léčbou budoucnosti by se pak mohla stát terapie genová.

1.2.1 Chemoterapie nádorových onemocnění

Chemoterapie představuje systémovou léčbu založenou na podávání cytostatik, léčiv s cytotoxickými účinky, které zasahují do buněčného cyklu nádorové buňky a brání tak jejímu dělení. Vlivem jejich nedostatečné selektivity však dochází i k poškození zdravých buněk. Cytostatická léčba je ve výsledku kompromisem mezi terapeutickým účinkem a přijatelnou toxicitou vůči zdravé tkáni. K chemoterapii lze přiřadit i hormonální léčbu hormon-dependentních nádorů.

Podle vztahu chemoterapie k chirurgické léčbě se rozlišuje chemoterapie adjuvantní, která je indikována pooperačně a jejím cílem je eradikace metastáz, a chemoterapie neoadjuvantní. Ta je naopak aplikována před zákrokem a zlepšuje operabilitu nádoru zmenšením jeho rozsahu. Úspěšnost cytostatické léčby u nádorových onemocnění s horší prognózou lze ovlivnit především aplikací vysokých dávek cytostatik v doprovodu podpůrných léčiv či kombinací cytostatik [23, 36, 60].

1.2.2 Farmakokinetika protinádorových léčiv

Farmakokinetika, zabývající se osudem léčiva v organismu po jeho aplikaci, zahrnuje následující pochody:

Absorpcí cytostatika se rozumí jeho přestup z místa podání do krevního řečiště (s výjimkou podání intravenózního). Rychlost a stupeň absorpce je nejvíce ovlivněna aplikační cestou, lékovou formou, fyzikálně-chemickými vlastnostmi cytostatika a jeho prostupem biomembránami.

Distribuce cytostatika, transport mezi krevním řečištěm a tkáněmi, závisí především na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech a na prokrvení příslušné tkáně. V cévním prostoru se cytostatikum může vázat na bílkoviny krevní plazmy, čímž se snižuje jeho dostupnost pro cílovou tkáň. Z extracelulárního prostoru pak může docházet k vazbě cytostatika na necílové tkáně. V buňce se následně rozděluje mezi bílkoviny a lipidy a pouze část cytostatika se váže na cílový receptor a vyvolá účinek.

Biotransformace čili metabolismus cytostatika je dvoustupňový proces biochemických přeměn katalyzovaných enzymy mikrosomální frakce buněk jater, plic, ledvin a jiných orgánů. V první fázi biotransformace se sledem oxidačních, redukčních a hydrolytických reakcí mění fyzikální vlastnosti cytostatika, především se zvyšuje jeho polarita a stává se tak lépe rozpustným. Následně může léčivo podléhat ve druhé fázi

biotransformace spojení (konjugaci) s endogenní látkou (např. s kyselinou glukuronovou, glutathionem, glycinem). Tím se léčivo detoxifikuje, stane se ve vodě více rozpustným a připraveným k exkreci. Místo detoxifikace může naopak dojít ke změně účinnosti léčiva bioaktivací, kdy se aplikovaná neúčinná forma (proléčivo, prodrug) vlivem metabolických přeměn stane formou účinnou.

Exkrece neboli vylučování cytostatika či jeho metabolitů probíhá v největší míře ledvinami. Nejvíce přitom závisí na povaze daného cytostatika, jeho vazbě na bílkoviny a biotransformaci, glomerulární filtraci a tubulární resorpci. Snadno jsou exkretovány látky polární, naopak lipofilní látky jsou v tubulech často zpětně resorbovány [21, 23].

1.2.3 Mechanismus účinku protinádorových léčiv

Léčba konvenčními cytostatiky je založena na omezení proliferace nádorových buněk. Jejich cytotoxický účinek je vysvětlován následujícími mechanismy:

Inhibicí klíčových enzymů syntézy nukleových kyselin. Tímto mechanismem působí léčiva, která se pro svoji strukturní podobnost endogenním látkám nazývají antimetabolity. Patří mezi ně především analoga kyseliny listové a analoga nukleotidů. Ta se navíc inkorporují do molekuly DNA i RNA za vzniku „falešných“ nukleových kyselin [18, 21, 35].

Poškozením struktury nukleových kyselin. Procesy, jako jsou alkylace guaninu v DNA, interkalace mezi páry bazí DNA, zlomy v jednom popřípadě obou řetězcích DNA, inhibice topoisomerasy I a II, mají za následek poruchu funkce DNA vedoucí k inhibici replikace a transkripce [18, 23, 35].

Poškozením mikrotubulárního proteinu. Látky, které inhibují syntézu mikrotubulů nebo mikrotubuly stabilizují, uplatňují svůj účinek v průběhu mitotického dělení. Jsou proto nazývány mitotickými jedy. Poškozené mikrotubuly následně vedou k nesprávné funkci dělicího vřeténka, a tím k zastavení buněčného dělení [18, 21, 23, 35].

Mechanismu inhibice proteosyntézy, s výjimkou L-asparaginas [18], a poškození buněčné stěny se v praxi příliš nevyužívá.

1.3 Ellipticin

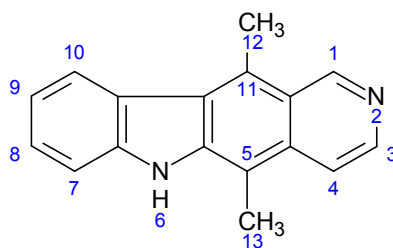
Ellipticin, systematickým názvem 5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol, se chemicky řadí mezi pyrido-karbazoly a patří mezi rostlinné alkaloidy čeledi *Apocynaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*). Poprvé byl izolován v roce 1959 z listů stromu *Ochrosia elliptica* Labill. (Obrázek č. 2) divoce rostoucích v Oceánii [12].



Obrázek č. 2 *Ochrosia elliptica* Labill. [32].

Ellipticin (Obrázek č. 3) a jeho polárnější deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-N²-ellipticinium, 9-chloro-N²-methylellipticinium, 9-methoxy-N²-methylellipticinium a 9-dimethyl-amino-ethoxy-ellipticin) vykazují výraznou protinádorovou aktivitu [24, 40]. Využívají se především k léčbě některých typů leukémií, pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, karcinomu štítné žlázy a dalších [55]. Ellipticin i některé jeho deriváty vykazují také anti-HIV aktivitu [24, 40].

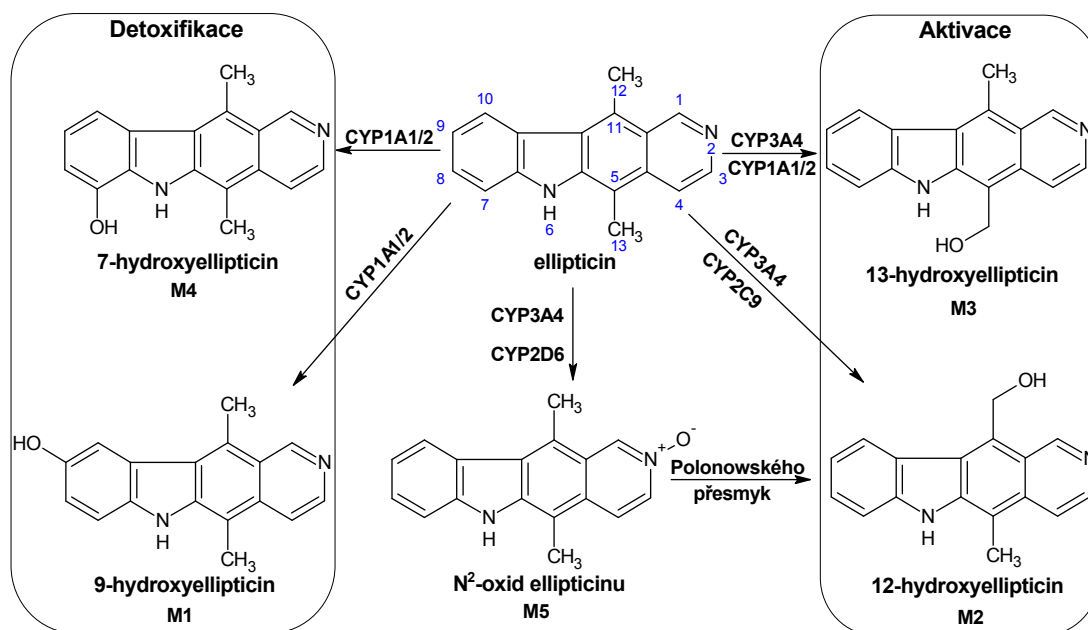
Hlavní důvod zájmu o ellipticin a jeho deriváty v klinické praxi spočívá ve vysoké účinnosti proti některým nádorovým onemocněním a v nízké hematologické toxicitě a hepatotoxicitě [4]. Slabé vedlejší účinky, jako je nevolnost, zvracení, únava či svalový třes, zpravidla nevedou k pozastavení léčby [17, 34]. Nicméně většina ellipticinů náleží k potenciálním mutagenům pro *Salmonella typhimurium*, bakteriofág T4, *Neurospora crassa* a pro savčí buňky. V *Escherichia coli* navíc indukuje profága lambda [55].



Obrázek č. 3 Struktura ellipticinu [upraveno z 48].

1.3.1 Biotransformace ellipticinu

V organismu je ellipticin přeměňován až na pět metabolitů (Obrázek č. 4). Detoxifikační metabolity 9-hydroxyellipticin (M1) a 7-hydroxyellipticin (M4) a aktivační metabolity 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N²-oxid ellipticinu (M5) nejsou tvořeny jen cytochromy P450 lidských jaterních mikrosomů, ale i mikrosomy modelových organismů (potkan a králík) [47].



Obrázek č. 4 Schéma metabolismu ellipticinu lidskými cytochromy P450 [upraveno z 55].

Z obrázku č. 4 je zřejmé, že oxidaci ellipticinu na detoxifikační metabolity katalyzují zejména cytochromy P450 1A1/2. Na metabolické aktivaci se pak podílí převážně cytochromy P450 3A4 následované izoenzymy 1A1/2, 2C9 a 2D6 [55, 61].

1.3.2 Mechanismy protinádorového působení ellipticinu

Protinádorový účinek ellipticinu je vysvětlován následujícími mechanismy:

Interkalací ellipticinu do molekuly DNA, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Ta je zprostředkována slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi s komplementárními bázemi DNA [4]. Pro orientaci ellipticinu v DNA je rozhodující interakce mezi jeho methylovou skupinou a thyminem v interkalačním místě. Vzhledem ke své fluorescenci se ellipticin používá jako modelová sloučenina pro interkalační studie [44].

Inhibicí topoisomerasy II, která je také předmětem výzkumu. Ellipticin interaguje s molekulou DNA a proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu. Ten je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby zlomů v řetězci DNA s následkem buněčné smrti [10].

Selektivní inhibicí fosforylace proteinu p53, která je zapříčiněná inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy. Následné nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vést k indukci apoptózy [31].

Inhibicí oxidační fosforylace ellipticinem, který se kumuluje v mitochondriích, se narušuje energetická rovnováha v buňce. Značné snížení obsahu ATP v buňce pak ústí v její zánik [43].

Inhibicí telomerasy [4].

Všechny výše popsané mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém působení. Toto tvrzení je však v rozporu s jejich poměrně úzkou specifitou účinku vůči určitým typům neoplasie. Při terapii ellipticiny byla navíc u pacientů pozorována individuální variabilita v jejich odpovědi na podané léčivo. Z toho vyplývá, že specifické působení ellipticinu musí vycházet i z jiných mechanismů účinku. Možné vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku a selektivní odpovědi na ellipticiny lze nalézt v rozdílném enzymovém vybavení organismu. Enzymy podílející se na biotransformaci ellipticinu mohou vytvářet terapeuticky účinnější metabolity, které poškozují buňky nádoru efektivněji, případně vedou k jejich likvidaci [50].

1.3.3 Tvorba kovalentních aduktů s DNA

Další mechanismus účinku ellipticinu, který byl popsán teprve nedávno, spočívá v tvorbě kovalentních aduktů s DNA. Ellipticin se biotransformací katalyzovanou cytochromy P450 přeměňuje na aktivní metabolity, které jsou schopné kovalentní vazby na DNA [47]. Tato skutečnost byla předpokládána již DeMarinim, který navrhoval, že jeden z genotoxických účinků ellipticinu by mohl být důsledek metabolicky vytvořené kovalentní vazby s DNA [7]. Tvorba kovalentních aduktů byla dokázána dvěma nezávislými metodami, použitím [³H]ellipticinu a metodou „³²P-postlabeling“ [47].

Kovalentní adukty aktivovaného ellipticinu s DNA byly zjištěny *in vitro* v lidských nádorových buňkách prsního adenokarcinomu (MCF-7) [5], v leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM) [38], v nádorových buňkách neuroblastomu (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) [37] a glioblastomu (U87MG) [22]. K tvorbě aduktů s DNA dochází také *in vitro* v plicních fibroblastech čínského křečka (V79) transfekovaných lidskými cytochromy P450 3A4 a 1A1/2 [9] a *in vivo* v nádorových buňkách prsního adenokarcinomu potkana [55] a v neposlední řadě ve zdravých orgánech (játra, slezina, plíce, ledviny, srdce, mozek) potkanů a myši exponovaných ellipticinem [46, 49].

Ve všech testovaných systémech, *in vitro* i *in vivo*, se tvoří alespoň dva adukty aktivovaného ellipticinu s DNA (majoritní adukt a minoritní adukt). Tvorba majoritního aduktu závisí na přítomnosti aktivačních cytochromů P450, zatímco adukt minoritní vzniká

i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací [47]. „Kochromatografií“ vzniklých aduktů pomocí TLC a HPLC bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o shodné adukty (majoritní a minoritní) [57].

Cílovým deoxynukleotidem tvořícím v DNA adukty s aktivovaným ellipticinem je deoxyguanosin [57]. Jako metabolity odpovědné za tvorbu kovalentních aduktů byly prokázány 13-hydroxyellipticin (M3), který se váže na deoxyguanosin v DNA za vzniku majoritního aduktu, a 12-hydroxyellipticin (M2), případně N²-oxid ellipticinu (M5). Ten podléhá Polonowského přesmyku za vzniku 12-hydroxyellipticinu, jejichž vazbou v DNA se tvoří adukt minoritní [56]. Dva karbeniové ionty, ellipticin-13-ylum a ellipticin-12-ylum, vzniklé spontánním štěpením 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu, jsou předpokládanými reaktivními agens [54], které tvoří kovalentní vazbu s aminoskupinou guaninu v DNA [46].

1.4 Systém monooxygenas se smíšenou funkcí

Mezi klíčové enzymy metabolizující cizorodé látky (xenobiotika), tedy i léčiva, patří mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO systém z angl. Mixed Function Oxidases) [51]. MFO systém katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popřípadě redukčních reakcí, ve kterých využívá především molekulární kyslík [26].

Tento systém je lokalizován na vnější straně membrány endoplazmatického retikula, kde se účastní první fáze biotransformace xenobiotik [26]. Největší množství enzymů MFO systému bylo nalezeno v endoplazmatickém retikulu jaterních, plicních a ledvinných buněk, tedy v orgánech vystavených vlivu látek exogenní povahy [6]. Naopak endogenní látky (steroidy či mastné kyseliny) jsou metabolizovány systémem MFO umístěným také v mitochondriální membráně zejména buněk kůry nadledvin [26].

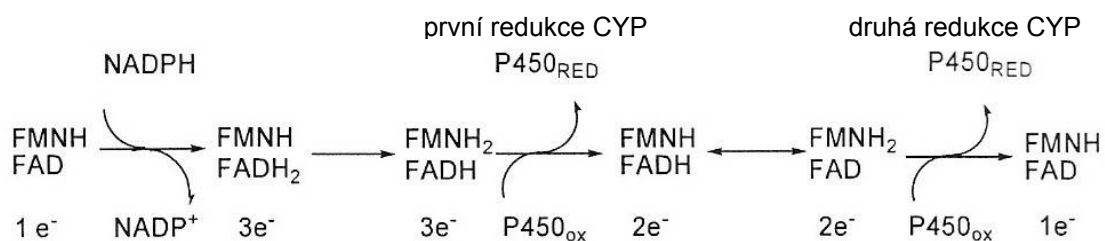
Výše uvedený systém se skládá ze tří základních komponent: NADPH:cytochrom P450 reduktasy (viz kapitola 1.4.1), která slouží jako dělič elektronového páru, cytochromu P450 (viz kapitola 1.4.2) jako terminální oxidasy a v neposlední řadě cytoplazmatické membrány. Lipidy této membrány zvyšují afinitu cytochromu P450 k substrátu změnou jeho konformace, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-NADPH:cytochrom P450 reduktasa a zároveň kumulují hydrofóbní látky jako substrát cytochromů P450 [26].

1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4), flavinový protein redukující řadu xenobiotik, je obligátní složkou MFO systému. Patří mezi membránově vázané enzymy, které katalyzují přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 [41] (v každém organismu je jedna forma této reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450). Přenos elektronů katalyzovaný již zmíněnou reduktasou byl popsán také na cytochrom c, hem oxygenasu, ferrikyanid i elongasu mastných kyselin [13].

NADPH:cytochrom P450 reduktasa, lokalizovaná v membráně endoplazmatického retikula, se skládá ze dvou funkčních domén, hydrofóbní (6 000 Da), kterou je enzym ukotven v membráně a jež tvoří funkční enzymový komplex s cytochromem P450, a domény hydrofilní (72 000 Da). Ta je složena z FAD- a FMN-vazebné domény, za jejichž vzájemnou prostorovou orientaci zodpovídá „spojovací“ struktura umístěná mezi nimi. FAD-vazebná doména nekovalentně váže NADPH, zatímco FMN-vazebná doména zprostředkovává transport elektronů na cytochrom P450 [62].

Současná přítomnost obou flavinových prostetických skupin (FAD i FMN) umožňuje působit jako dělič elektronového páru a redukovat tak cytochrom P450 ve dvou oddělených krocích (první a druhá redukce cytochromu P450). Zdrojem redukčních ekvivalentů je pak další koenzym této reduktasy, NADPH. Akceptorem těchto elektronů respektive atomů vodíku je FAD, který je následně předává FMN. FMNH₂ je nakonec (v případě savčí reduktasy) zodpovědný za jednoelektronovou redukci cytochromu P450 (Obrázek č. 5) [46]. Transport druhého elektronu reakčního cyklu MFO systému může zprostředkovat i NADH:cytochrom b₅ reduktasa, která tak v tomto kroku zastoupí NADPH:cytochrom P450 reduktasu. Na rozdíl od ní však tento enzym využívá NADH jako koenzymu [52].



Obrázek č. 5 Schéma funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy, CYP - cytochrom P450 [upraveno z 52].

1.4.2 *Cytochromy P450*

V roce 1958 objevili Garfinkel a Klingenberg v jaterních mikrosomech pigment, který po redukcí vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm [11, 19]. Roku 1964 Omura a Sato dokázali hemoproteinový charakter tohoto pigmentu a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450 [33].

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1), terminální oxidasa systému MFO, zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci (oxidasaová funkce) a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofóbního substrátu (monooxygenasaová funkce) [39]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu [13]. Elektrony potřebné k redukcí jsou transferované NADPH:cytochrom P450 reduktasou popřípadě NADH:cytochrom b₅ reduktasou [52].

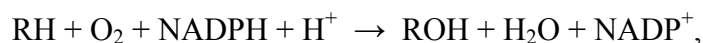
V eukaryotických buňkách je cytochrom P450 umístěn v membráně endoplazmatického retikula, v menší míře v mitochondriální membráně, zatímco cytochromy P450 prokaryotických buněk patří mezi enzymy rozpuštěné v cytoplazmě [52]. Společným rysem cytochromů P450 obou systémů je podobnost jejich struktury s výjimkou uspořádání aktivního místa, které je odlišné [2].

Cytochrom P450 patří mezi hemoproteiny, ve kterých je porfyrinový skelet (hem b) vázaný hydrofóbními silami a současně prostřednictvím thiolátové síry cysteylového zbytku přítomné v aktivním centru enzymu. Ta je pátým ligandem hemového železa a přispívá k výjimečným katalytickým a spektrálním vlastnostem, které odlišují tento enzym od ostatních hemoproteinů [3]. Jako šestý ligand je navázán atom kyslíku z molekuly vody [51].

Cytochromy P450 katalyzují následující reakce:

Oxidasová reakce představuje aktivaci biatomické molekuly kyslíku. Spontánní reakce atmosférického kyslíku s molekulami organických látek jsou spinově zakázané. Přesto se v každém aerobním organismu nachází řada proteinů nesoucích prostetickou skupinu s přechodným kovem či flavinem, díky kterým je organismus schopen oxidační potenciál kyslíku využít [6].

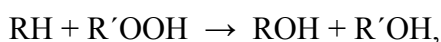
Oxygenasaová aktivita cytochromu P450 spočívá v zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofóbního substrátu [6]. Sumární rovnice této reakce, jejíž reakční mechanismus je detailně popsán v kapitole 1.4.3, je následující:



kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce [51].

V průběhu redukční reakce mohou elektrony přenesené NADPH:cytochrom P450 reduktasou přímo redukovat substrát a nebýt použity k aktivaci molekuly kyslíku. K takovéto reakci dochází, pokud je substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, tedy je vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo* [6].

Peroxidasovou aktivitou cytochromu P450 se rozumí reakce komplexu enzym-substrát s organickým peroxidem, který je donorem atomu kyslíku. Cytochrom P450 aktivovaný tímto způsobem je schopný katalyzovat hydroxylaci substrátu. Uvedená reakce probíhá neuspořádaným mechanismem čili navázání peroxidu na enzym je nezávislé na vazbě substrátu [52] a nevyžaduje NADPH jako zdroj elektronů. Sumární rovnice této reakce je následující:



kde RH je substrát, R'OOH organický hydroperoxid, ROH hydroxylovaný produkt reakce a R'OH alkohol vzniklý redukcí organického hydroperoxidu (viz Obrázek č. 6) [15].

K produkci peroxidu vodíku a aktivních forem kyslíku dochází, pokud MFO systém interaguje s hydrofóbním substrátem, který se obtížně hydroxyluje. Tento substrát sice tvoří komplex s cytochromem P450, ale bez následného zabudování molekuly kyslíku. Jinými slovy proběhne oxidasová fáze funkce enzymu (aktivace molekuly kyslíku), která však není následovaná fází oxygenasovou [6].

Současné systematické názvosloví cytochromů P450 bylo navrženo Nebertem a spolupracovníky [27], kteří zavedli CYP jako zkratku pro cytochrom P450 (CYtochrome P450).

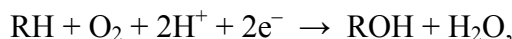
Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách zvaných izoformy či izoenzymy. Tyto formy cytochromů P450 jsou na základě podobnosti své sekvence aminokyselin, nikoli dle podobnosti substrátu, rozděleny do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40 %) a podrodin (sekvenční homologie větší než 55 %) [29]. Rodiny cytochromů P450 jsou značeny prvním číslem za zkratkou cytochromu P450 (CYP1) následované velkým písmenem značícím podrodinu (CYP1A). Jednotlivé izoenzymy jsou dále označeny číslem za písmenem podrodiny (CYP1A1) [28].

V lidském organismu byly dosud nalezené formy cytochromů P450 klasifikovány do 18 rodin. Z těchto rodin cytochromů P450 se pouze čtyři účastní metabolismu xenobiotik potažmo léčiv, CYP1, CYP2, CYP3 a v menší míře CYP4. Ostatní rodiny participují na metabolismu kyseliny arachidonové, mastných kyselin, biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin a dalších [29].

1.4.3 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

Monooxygenasová reakce představuje hlavní reakci katalyzovanou cytochromy P450. Zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho jeho atomu do molekuly substrátu. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony, které pocházejí z NADPH, přenesenými NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Donorem druhého elektronu může být, kromě již zmíněného NADPH, i NADH přenesený NADH:cytochrom b_5 reduktasou [13]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu [52].

Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí:



kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce [52].

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a je pravděpodobně složen z osmi kroků (Obrázek č. 6) [52].

I. V klidovém stavu je ion železa hemu ve ferri formě (Fe^{III}) a je hexakoordinován (v nízkospinovém stavu). Šestou valenci železa obsazuje kyslík vody či aminokyselinový ligand.

II. Vniknutím molekuly substrátu (RH) do aktivního místa je vytlačen šestý ligand železa, čímž se změní koordinace železa, které se stane pentakoordinovým (vysokospinový stav). Zároveň s tím nastane změna konformace v molekule enzymu.

III. Tato konformační změna způsobená navázáním substrátu umožňuje jednoelektronovou redukci cytochromu P450 prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Přitom se železo redukuje na ferro formu (Fe^{II}), ale zůstává stále penta-koordinováno.

IV. Po navázání molekulárního kyslíku se vytvoří ternární ferri-superoxidový komplex ($\text{RHFe}^{3+}[\text{O}_2^- \cdot]$) a dochází ke změně koordinace železa zpět na hexakoordinovanou formu. Tento nestabilní komplex je dále redukován druhým elektronem přeneseným buď NADPH:cytochrom P450 reduktasou, nebo NADH:cytochrom b_5

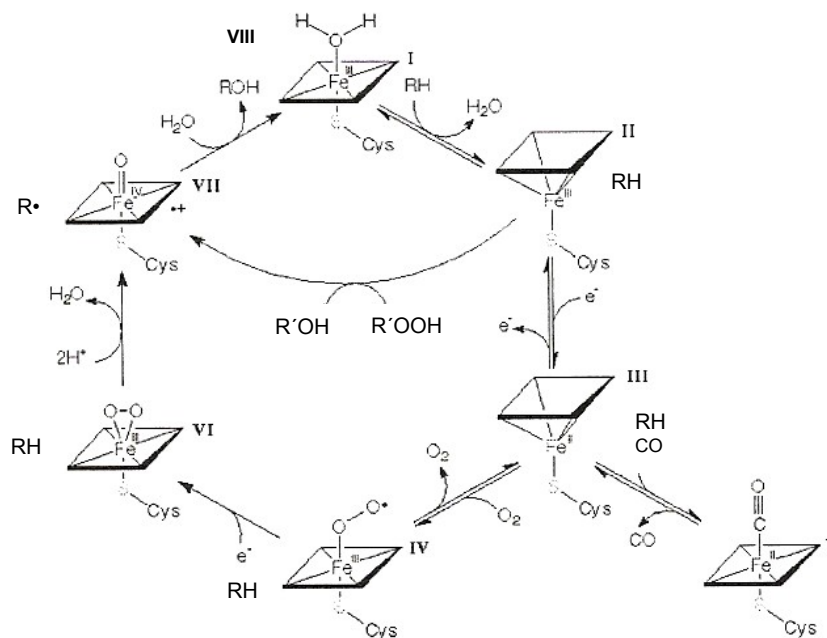
reduktasou. Tímto krokem se aktivuje vázaná molekula kyslíku na peroxidový anion (O_2^{2-}) [15, 52].

V. Vazba molekuly kyslíku na III. formu může být inhibována přítomností oxidu uhelnatého. Inkorporací této molekuly by vznikl ternární ferrokomples ($RHFe^{2+}[CO]$) [26].

VI. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku je po redukci druhým elektronem již zcela aktivovanou formou cytochromu P450. Tento krok zahrnuje heterolytické rozštěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku zůstane vázán na hemové železo za tvorby ferrioxenového komplexu ($RH[Fe-O]^{3+}$). Druhý atom kyslíku je zatím redukován na O^{2-} , přijme dva protony a uvolní se jako molekula vody.

VII. Vzniklý komplex se stabilizuje mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Tímto způsobem vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopný vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za tvorby radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na železo hemu ($[R\cdot][Fe-OH]^{3+\bullet}$).

VIII. V posledním kroku spolu substrátový a hydroxylový radikál rekombinují a vzniká hydroxyderivát substrátu ($[ROH]Fe^{3+}$). Následně produkt (ROH) z aktivního centra enzymu disociuje a obnovuje se nativní forma cytochromu P450 [15, 52].



Obrázek č. 6 Schéma reakčního mechanismu monooxygenasové reakce s naznačenou peroxidasovou aktivitou cytochromu P450, RH - substrát, ROH - hydroxylovaný produkt reakce, $R'OOH$ - organický hydroperoxid a $R'OH$ - alkohol vzniklý redukcí organického hydroperoxidu [upraveno z 52].

1.5 Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ může být fakultativně obsažen v systému monooxygenas se smíšenou funkcí [59]. Je to malý (cca 15 900 Da), cylindrický, kyselý membránový protein [20], který obsahuje nekovalentně vázanou jednu či dvě molekuly hemu b. Hem je součástí větší hydrofilní domény proteinu, zatímco menší doména hydrofóbní slouží k ukotvení cytochromu b₅ v membráně [25]. Tento hemoprotein je lokalizován na vnější straně membrány endoplazmatického retikula [59]. Cytochrom b₅ značně ovlivňuje přenos elektronů řady oxidačních reakcí v různých biologických tkáních. Ty zahrnují anabolismus lipidů a steroidů, rovněž jako katabolismus xenobiotik a endogenních látek [42].

1.5.1 Mechanismy působení cytochromu b₅

Působení cytochromu b₅ v rámci MFO systému není zcela vysvětlené. Mechanismus jeho účinku je popisován čtyřmi následujícími způsoby [42]:

První mechanismus účinku zahrnuje přímý přenos elektronu z cytochromu b₅ do monooxygenasového cyklu. V monooxygenasové reakci cytochromů P450 (viz kapitola 1.4.3) se jako limitující faktor jeví rychlost přijetí druhého elektronu, který je potřeba k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku vázaného na cytochrom P450. Není-li druhý elektron dodán dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu za uvolnění superoxidového radikálu místo oxidovaného substrátu [6].

Druhou variantou tohoto mechanismu je předpoklad, že se cytochrom b₅ chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tím, že redukuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Díky cytochromu b₅ může druhý elektron rychleji vstoupit do monooxygenasové reakce, čímž se zabrání rozpadu komplexu superoxidovaného aniontu. Vytvoří se tak aktivovaný kyslík, který reaguje se substrátem za vzniku produktu [6].

Třetí vysvětlení mechanismu navrhuje tvorbu komplexu cytochromu b₅ s cytochromem P450. Při absenci cytochromu b₅ nejprve přijímá cytochrom P450 elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Poté dochází k navázání kyslíku následované přijetím druhého elektronu od stejné reduktasy. Vytvoření komplexu cytochromu P450 s cytochromem b₅ by posílilo rychlost formování aktivního kyslíku odstraněním dvojí interakce cytochromu P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou [6].

Ve čtvrtém mechanismu působení cytochromu b_5 se předpokládá skutečnost, že tento protein slouží jako efektor bez redoxní role v monooxygenasové reakci. To by potvrdzovalo stimulaci některých cytochromů P450 jak cytochromem b_5 , tak i cytochromem b_5 postrádajícím hem, tedy apo-cytochromem b_5 . Cytochrom b_5 v takovém případě nejspíš posiluje rozklad oxygenovaného cytochromu P450 na produkty nebo usnadňuje tok elektronů přes systém [6].

1.5.2 Vliv cytochromu b_5 na reakce katalyzované cytochromy P450

Interakci cytochromu b_5 s cytochromem P450 vysoce ovlivňuje izoforma cytochromu P450 i navázaný substrát [42]. Cytochrom b_5 je na jedné straně schopný stimulovat řadu reakcí katalyzovaných cytochromy P450, na druhou stranu může působit i jako inhibitor katalytické aktivity těchto mikrosomů, nebo být zcela bez vlivu [16]. Podstata vlivu tohoto proteinu je prozatím známá pouze u některých izoform cytochromu P450 a jejich substrátů [42].

2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studium oxidace ellipticinu cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému. Konkrétně se jednalo o srovnání účinnosti lidských cytochromů P450 1A1/2 a 3A4 exprimovaných v membráně *Escherichia coli* a v membráně endoplazmatického retikula hmyzích buněk v této oxidaci. Zároveň byl sledován vliv množství NADPH:cytochrom P450 reductasy exprimované v prokaryotickém systému na provedenou oxidaci. NADPH:cytochrom P450 reductasa je důležitým donorem elektronů v systému monooxygenas se smíšenou funkcí. Cílem práce bylo rovněž poznat úlohu cytochromu b₅, který je fakultativní složkou mikrosomálního monooxygenasového systému, v modulaci oxidace ellipticinu uvedenými cytochromy P450.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie, které jsme použili v experimentech, pocházejí z následujících zdrojů:

BD Biosciences (USA)

Cytochromy P450 exprimované v eukaryotickém systému (SupersomesTM, mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných konstrukty Baculoviru obsahujících cDNA jednoho z následujících lidských cytochromů P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou: CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4)

Cypex (Velká Británie)

Cytochromy P450 exprimované v prokaryotickém systému (Bactosomes, zlomky membrán buněk *Escherichia coli* s vneseným plazmidem obsahujícím cDNA jednoho z následujících lidských cytochromů P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou o vyšší a nižší hladině: CYP1A1R, CYP1A1LR, CYP1A2R, CYP1A2LR, CYP3A4R, CYP3A4LR)

Fluka (Švýcarsko)

Methanol

Laboratoř katedry biochemie PŘF UK (Česká republika)

Cytochrom b₅ izolovaný z králičích jater

PLIVA Lachema (Česká republika)

Ethylacetát, KH₂PO₄, kyselina octová, methanol, MgCl₂

REANAL (Maďarsko)

Glukosa-6-fosfát

MERCK (Německo)

Ethylacetát

SIGMA-ALDRICH (USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO), ellipticin, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, heptansulfonát sodný, oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺)

3.2 Použité přístroje

Automatické pipety

BIOHIT (Finsko), NICHIRYO (Japonsko)

Centrifugy

Acid-Resistant Vacuum CentriVap Concentrator, LABCONCO (USA), Microshaker type ML 1, Mini Centrifuge, Labnet (USA), MSE Micro Centaur, SANYO (Velká Británie)

pH metr

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA)

Sonikátor

Ultrasonic Compact Cleaner TESON 1, Tesla (Česká republika)

Systém HPLC

P580 pump, Automated Sample Injector ASI-100, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, DIONEX (USA), kolona Reversed Phase Ultrasphere ODS, C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm, BECKMAN COULTER (USA)

Termostatová lázeň

Thermomixer Compact, eppendorf (Německo)

Váhy

Analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), předvážky KERN EW600-2M (Německo)

Vortex

MS 2 Minishaker, IKA Janke & Kunkel (Německo)

3.3 Metody

3.3.1 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému

Inkubační směs o objemu 250 μ l jsme připravili vždy ve dvou paralelních vzorcích. Do Eppendorfových zkumavek jsme pipetovali složky v následujícím pořadí:

- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 25, 50, 100 nebo 200 nM (6,25; 12,5; 25 nebo 50 pmol) cytochrom P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovaný v prokaryotickém a eukaryotickém systému
- 10 μ M ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- NADPH-generující systém (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Oxidaci jsme startovali přidáním 25 μ l NADPH-generujícího systému. Směs jsme inkubovali za stálého míchání v Thermomixeru Compact za přítupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Následně jsme do každé zkumavky přidali 5 μ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

Reakci jsme terminovali přidáním 1 ml ethylacetátu. Směs jsme protřepali v Microshaker type ML 1 při 450 RPM po dobu 3 minut. Centrifugací v MSE Micro Centaur při 13 000 RPM jsme od sebe za dobu 3 minut oddělili dvě fáze. Výše popsanou extrakci jsme provedli dvakrát. Obě organické fáze jsme odebrali do nových Eppendorfových zkumavek a odpařili dosucha v Acid-Resistant CentriVap Vacuum Concentrator. Vzorky jsme před následující analýzou uchovávali při teplotě -20 °C.

3.3.2 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému za přítomnosti cytochromu b₅

Inkubační směs o objemu 250 μ l jsme připravili vždy ve dvou paralelních vzorcích. Do Eppendorfových zkumavek jsme pipetovali složky v následujícím pořadí:

- fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- 25, 50, 100 nebo 200 nM (6,25; 12,5; 25 nebo 50 pmol) cytochrom P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovaný v prokaryotickém a eukaryotickém systému

- 125, 250, 500 nebo 1 000 nM (31,25; 62,5; 125 nebo 250 pmol) cytochrom b₅ v inkubační směsi s cytochromem P450 3A4
- 150, 300, 600 nebo 1 200 nM (37,5; 75; 150 nebo 300 pmol) cytochrom b₅ v inkubační směsi s cytochromy P450 1A1 a 1A2
- 10 μM ellipticin (2,5 mM zásobní roztok v DMSO)
- NADPH-generující systém (10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Směs cytochromu P450 a cytochromu b₅ jsme inkubovali za přístupu vzduchu při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Po přidání 1 μl ellipticinu jsme oxidaci startovali 25 μl NADPH-generujícího systému. Směs jsme inkubovali za stálého míchání v Thermomixeru Compact za přístupu vzduchu při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Následně jsme do každé zkumavky přidali 5 μl fenacetinu (1 mM roztok v methanolu) jako vnitřního standardu pro HPLC.

Následující postup je shodný s postupem popsáným v kapitole 3.3.1.

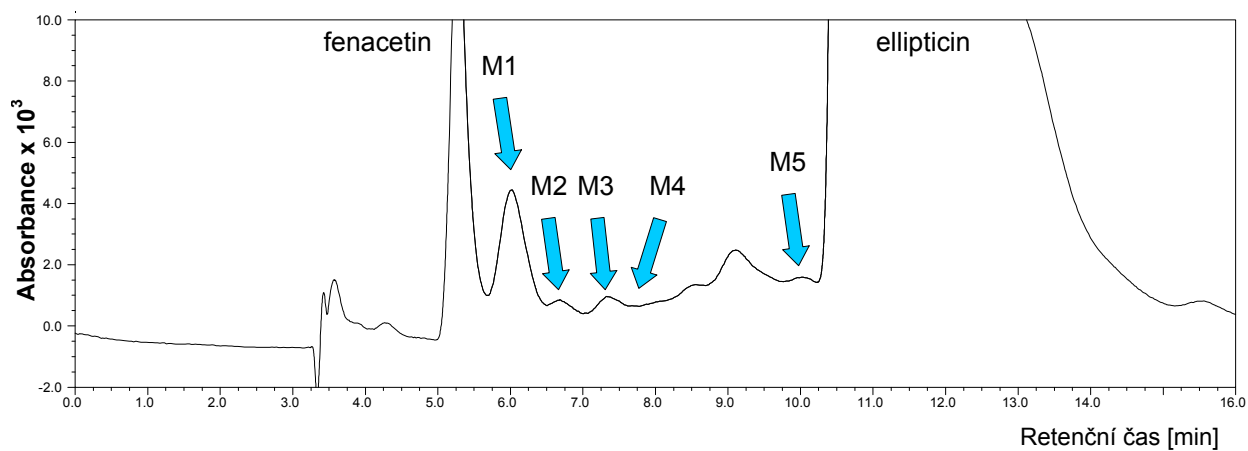
3.3.3 Separace metabolitů ellipticinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Vzorky obsahující metabolity ellipticinu, které jsme připravili postupy popsány v kapitolách 3.3.1 a 3.3.2, jsme rozpustili v 25 μl methanolu. Roztoky jsme protřepali na MS 2 Minishaker a centrifugovali na Microshaker type ML 1. Ellipticin a jeho metabolity ve vzorcích jsme separovali pomocí HPLC s obrácenými fázemi (RP-HPLC).

Mobilní fázi s přídavkem 1-heptansulfonové kyseliny byl 64 % methanol, 5 mM heptansulfonát sodný a 32 mM kyselina octová. Z mobilní fáze jsme vždy před použitím odstranili vzduchové bubliny sonikací v Ultrasonic Compact Cleaner TESON 1 po dobu 1 hodiny. Separování jednotlivých metabolitů ellipticinu jsme uskutečnili na koloně Ultrasphere ODS chemicky modifikované oktadecyly (C₁₈) termostátované při 37 °C. Průtok mobilní fáze kolonou jsme nastavili na 0,7 ml/min a nástřik vzorku na kolonu autosamplerem ASI-100 na 20 μl. Jednotlivé metabolity ellipticinu jsme detekovali fotometrickým detektorem (UVD) při vlnové délce 296 nm.

Ke sběru dat a vyhodnocení chromatogramů ellipticinu a jeho metabolitů jsme použili program Chromeleon. Výsledky jsme zpracovali v tabulkovém procesoru MS Excel.

Níže je uveden příklad separace ellipticinu a jeho metabolitů tvořených oxidací lidskými cytochromy P450 metodou HPLC (Obrázek č. 7).



Obrázek č. 7 HPLC ellipticinu a jeho metabolitů za použití fenacetinu jako vnitřního standardu. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5).

4 VÝSLEDKY

4.1 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému

V práci jsme sledovali aktivitu lidských cytochromů P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovaných v prokaryotickém a eukaryotickém systému v oxidaci ellipticinu. Tuto aktivitu jsme zjišťovali za přítomnosti různých látkových množství jednotlivých cytochromů P450. Zároveň jsme zkoumali vliv cytochromu b_5 na tuto oxidaci. Obsahy cytochromů P450 1A1 a 1A2 byly s cytochromem b_5 ve vzájemném poměru 1 : 6, zatímco v případě dalšího sledovaného cytochromu P450, 3A4, byl poměr mezi tímto enzymem a cytochromem b_5 1 : 5.

Ve všech měřeních jsme porovnávali aktivitu cytochromů P450 jednoho eukaryotického a dvou prokaryotických systémů. Prokaryotické systémy se vzájemně lišily hladinou exprimované NADPH:cytochrom P450 reductasy. Ta je důležitým donorem elektronů pro funkci cytochromů P450 [52]. Její množství tedy ovlivňuje funkci jednotlivých cytochromů P450.

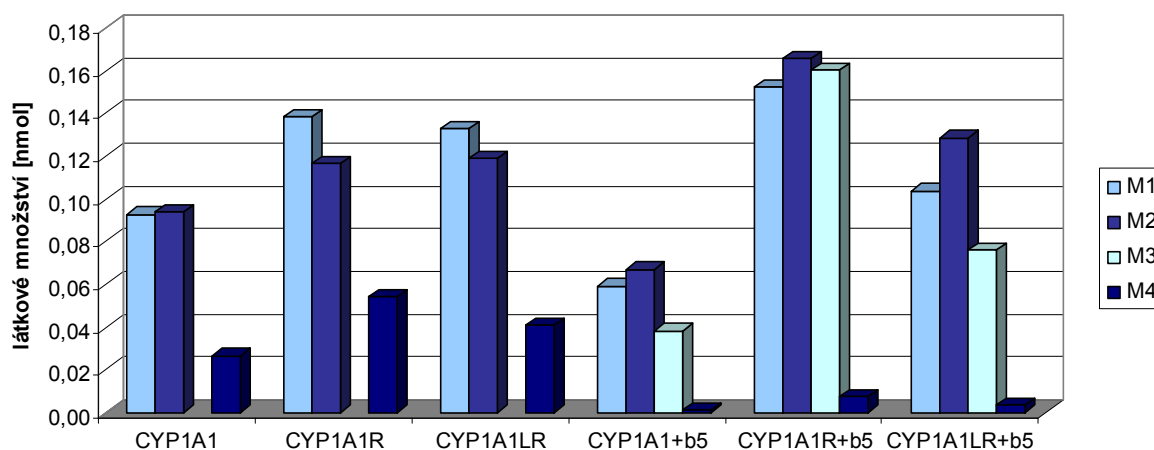
4.1.1 Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1

Při oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1 (CYP1A1) vznikají jeho čtyři metabolity (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Za přítomnosti cytochromu b_5 (cyt b_5) je pak ellipticin oxidován na všech pět metabolitů (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Přidání cyt b_5 moduluje aktivitu CYP1A1 tak, že vzniká i 13-hydroxyellipticin (M3). Vzhledem k možné nepřesnosti ve stanovení N^2 -oxidu ellipticinu nebyla jeho tvorba kvantifikována (blízké hodnoty retenčního času s retenčním časem ellipticinu) (viz Obrázek č. 7).

Na rozdíl od tvorby 13-hydroxyellipticinu (M3), byla tvorba ostatních metabolitů ellipticinu (9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu) cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému cyt b_5 snížena. V přítomnosti cyt b_5 vzniká reakcí katalyzovanou CYP1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy s ellipticinem menší množství 9-hydroxyellipticinu (M1) a 13-hydroxyellipticinu (M3).

CYP1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému při různých hladinách NADPH:cytochrom P450 reductasy produkuje větší množství metabolitů ellipticinu než CYP1A1 v systému eukaryotickém. V tomto případě se projevuje odlišný vliv cyt b₅ na oxidaci ellipticinu.

7-hydroxyellipticin je mnohem více produkován CYP1A1 exprimovaným v prokaryotických i eukaryotických systémech bez cyt b₅ (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 8 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému (CYP1A1) a prokaryotickém systému o dvou hladinách NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1R a CYP1A1LR) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b₅. Vzorčky obsahovaly cytochromy P450 1A1 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol a 75 pmol cytochromu b₅. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

4.1.2 Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2

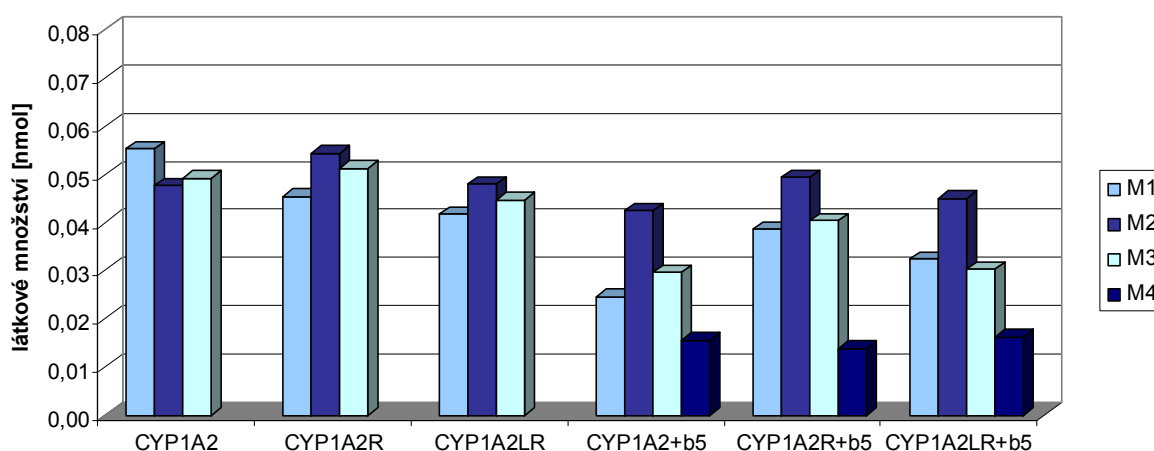
Oxidací ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2 (CYP1A2) za přítomnosti cyt b₅ vzniká všech pět jeho metabolitů (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu), na rozdíl od situace, kdy cyt b₅ přítomen není. V tomto případě nevzniká 7-hydroxyellipticin (M4). Jak již bylo uvedeno výše, množství N²-oxidu ellipticinu nebylo v experimentech kvantifikováno vzhledem k možné nepřesnosti v měření.

V obou systémech (eukaryotickém i prokaryotickém) vzniká bez přítomnosti cyt b₅ větší množství metabolitů, kromě 12-hydroxyellipticinu (M2). Ten se tvoří prakticky ve stejném množství jak v přítomnosti cyt b₅, tak i bez něj.

Lidský CYP1A2 exprimovaný jak v eukaryotickém, tak i v prokaryotickém systému oxiduje ellipticin prakticky se stejnou efektivitou.

Při oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 1A2 exprimovaným v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A2LR) se tvoří menší množství všech metabolitů ellipticinu než v systému s vyšší hladinou reduktasy (CYP1A2R), jak v přítomnosti cyt b₅, tak i bez něj. Poměr jednotlivých metabolitů je ve všech čtyřech případech stejný.

Množství vznikajícího 7-hydroxyellipticinu (M4) jsou srovnatelná v eukaryotickém i prokaryotickém systému (pouze v přítomnosti cyt b₅) (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 1A2 exprimovaným v eukaryotickém systému (CYP1A2) a prokaryotickém systému o dvou hladinách NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CYP1A2R a CYP1A2LR) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b₅. Vzorčky obsahovaly cytochromy P450 1A2 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol a 75 pmol cytochromu b₅. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

4.1.3 Oxidace ellipticinu lidským cytochromem P450 3A4

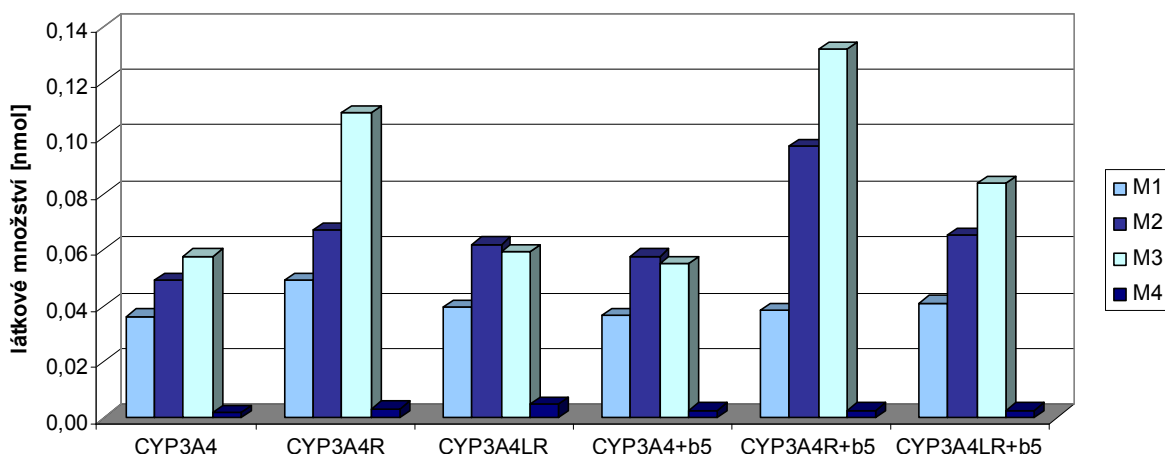
V přítomnosti cyt b₅ stejně jako bez něj vzniká oxidací ellipticinu cytochromem P450 3A4 (CYP3A4) všech pět jeho metabolitů (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu). Vzhledem k možné nepřesnosti ve stanovení N²-oxidu ellipticinu jeho tvorba nebyla opět kvantifikována.

Přítomnost cyt b_5 v inkubační směsi potencuje aktivitu CYP3A4 v oxidaci ellipticinu. Množství vznikajících metabolitů jak v eukaryotickém, tak prokaryotickém systému jsou za přítomnosti cyt b_5 větší než bez tohoto proteinu. Uvedené tvrzení se týká především množství vznikajícího 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3).

Lidský CYP3A4 exprimovaný v eukaryotickém systému produkuje menší množství metabolitů než CYP3A4 v prokaryotickém systému, a to jak bez přidání cyt b_5 , tak i s ním.

13-hydroxyellipticin (M3) je tvořen ve větším množství při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 exprimovaným v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP3A4R) než oxidací cytochromem P450 3A4 exprimovaným s nižší hladinou reductasy (CYP3A4LR).

Ve všech hodnocených systémech vzniká srovnatelné množství 9-hydroxyellipticinu (M1) (Obrázek č. 10).



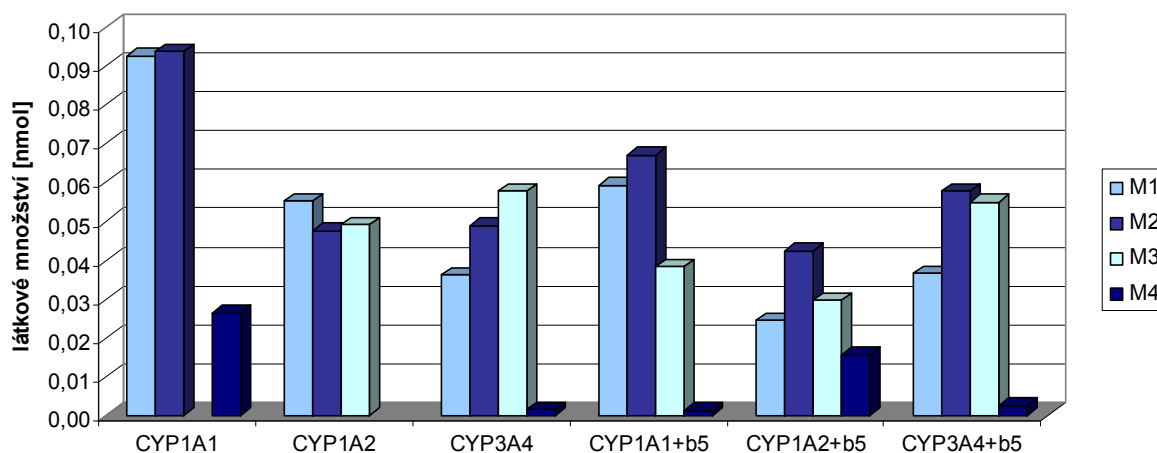
Obrázek č. 10 Oxidace ellipticinu cytochromem P450 3A4 exprimovaným v eukaryotickém systému (CYP3A4) a prokaryotickém systému o dvou hladinách NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP3A4R a CYP3A4LR) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b_5 . Vzorčky obsahovaly cytochromy P450 3A4 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol a 62,5 pmol cytochromu b_5 . 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

4.2 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém a eukaryotickém systému - srovnání efektivity jednotlivých izoenzymů

4.2.1 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v eukaryotickém systému

Při oxidaci ellipticinu lidským cytochromem P450 1A1 exprimovaným v eukaryotickém systému (CYP1A1) vzniká větší množství jeho metabolitů (9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu) než oxidací cytochromy P450 1A2 a 3A4 exprimovanými v tomtéž systému (CYP1A2 a CYP3A4). CYP1A2 a CYP3A4 oxidují ellipticin prakticky se stejnou efektivitou v tvorbě 9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3).

Přítomnost cyt b₅ moduluje aktivitu CYP3A4 tak, že vzniká větší množství 12-hydroxyellipticinu (M2). Naopak přidáním tohoto proteinu do inkubační směsi obsahující CYP1A1 a CYP1A2 se sníží tvorba všech metabolitů ellipticinu katalyzovaná oběma cytochromy P450 (Obrázek č. 11).

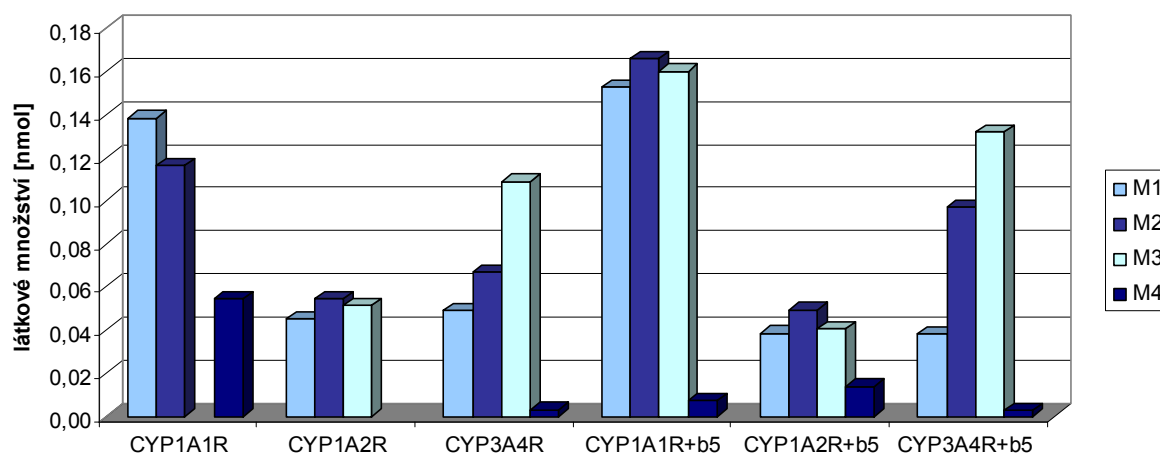


Obrázek č. 11 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v eukaryotickém systému (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b₅. Vzorčky obsahovaly cytochromy P450 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol, cytochrom b₅ 75 pmol pro CYP1A1 a CYP1A2, 62,5 pmol pro CYP3A4. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

4.2.2 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy

Oxidací ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A2R a CYP3A4R) vzniká srovnatelné množství 9-hydroxyellipticinu (M1) a 12-hydroxyellipticinu (M2). Vyšší hladina NADPH:cytochrom P450 reductasy potencuje aktivitu CYP3A4R v tvorbě 13-hydroxyellipticinu (M3), tohoto metabolitu vzniká více než za katalýzy CYP1A2R. Vyšší hladina reductasy rovněž stimuluje oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1 (CYP1A1R), která je vyšší než u obou uvedených cytochromů P450.

V přítomnosti cyt b_5 je modulována aktivita CYP3A4R, a to především v tvorbě 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3). Při oxidaci ellipticinu CYP1A2R vzniká za přítomnosti cyt b_5 nižší množství všech jeho metabolitů (9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin) (Obrázek č. 12).

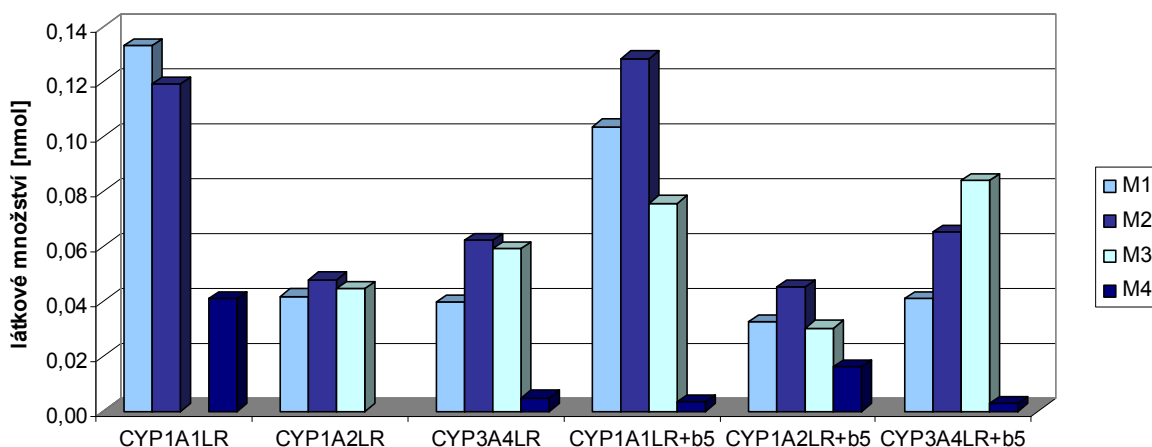


Obrázek č. 12 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1R, CYP1A2R, CYP3A4R) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b_5 . Vzorky obsahovaly cytochromy P450 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol, cytochrom b_5 75 pmol pro CYP1A1R a CYP1A2R, 62,5 pmol pro CYP3A4R. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

4.2.3 Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy

Lidský cytochrom P450 1A1 exprimovaný v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1LR) oxiduje ellipticin za tvorby většího množství 9-hydroxyellipticinu (M1) a 12-hydroxyellipticinu (M2) než cytochromy P450 1A2 a 3A4 exprimovanými v tomtéž systému se stejnou hladinou reductasy (CYP1A2LR a CYP3A4LR). Při oxidaci ellipticinu CYP1A2LR a CYP3A4LR vzniká prakticky srovnatelné množství jeho metabolitů (9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu).

Přidáním cyt b₅ do inkubační směsi s CYP1A1LR a CYP1A2LR se sníží tvorba 9-hydroxyellipticinu (M1) a 13-hydroxyellipticinu (M3), a to oběma cytochromy P450. Naopak přítomnost tohoto proteinu potencuje aktivitu CYP3A4LR tak, že vzniká větší množství 13-hydroxyellipticinu (M3) (Obrázek č. 13).



Obrázek č. 13 Oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému s nižší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy (CYP1A1LR, CYP1A2LR, CYP3A4LR) v levé polovině grafu. Pravá polovina grafu zobrazuje oxidaci stejnými cytochromy P450 za přítomnosti cytochromu b₅. Vzorky obsahovaly cytochromy P450 o celkovém látkovém množství 12,5 pmol, cytochrom b₅ 75 pmol pro CYP1A1LR a CYP1A2LR, 62,5 pmol pro CYP3A4LR. 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a 7-hydroxyellipticin (M4). Uvedené výsledky jsou průměry ze dvou měření.

5 DISKUZE

V rámci této bakalářské práce byla řešena problematika metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu katalyzovaného lidskými cytochromy P450 v závislosti na jejich expresi v eukaryotickém a prokaryotickém systému. Eukaryotický systém byl představován hmyzími buňkami, v jejichž membráně endoplazmatického retikula byly exprimovány lidské cytochromy P450 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou. Buňky *Escherichia coli*, v jejichž membráně byly také exprimovány lidské cytochromy P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa, tvořily systém prokaryotický. Byl tedy studován vliv eukaryotického a prokaryotického systému na efektivitu lidských cytochromů P450 oxidovat ellipticin na jeho metabolity.

K bližší charakterizaci metabolismu ellipticinu *in vitro* bylo použito mikrosomů izolovaných z transfekovaných hmyzích buněk a „zlomků“ membrán buněk *Escherichia coli*. Membránové systémy bylo nutné použít proto, že lidské cytochromy P450 metabolizující léčiva jsou exprimovány v membránách endoplazmatického retikula. Právě membrány pak diktují konformaci proteinu cytochromu P450 a jeho reduktasy (NADPH:cytochrom P450 reduktasy) esenciální pro enzymovou aktivitu obou těchto enzymů. V obou systémech byly exprimovány lidské cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 a NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Ve všech experimentech se ellipticin přeměňuje uvedenými cytochromy P450 na 4 až 5 metabolitů. Tvoří se 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5). N²-oxid ellipticinu byl eluován v retenčním čase blízkém retenčnímu času ellipticinu a pro možné zatížení chybou při stanovení nebyl kvantifikován. K separaci a detekci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi.

Při srovnání účinnosti lidských cytochromů P450 exprimovaných v eukaryotickém i prokaryotickém systému v oxidaci ellipticinu bylo zjištěno, že efektivita cytochromů P450 1A1/2 i 3A4 v produkci metabolitů ellipticinu je vyšší u izoenzymů exprimovaných v prokaryotickém systému oproti těm, které jsou exprimovány v systému eukaryotickém. Signifikantně byla stimulována aktivita cytochromu P450 1A1 exprimovaného v prokaryotickém systému, a to v tvorbě všech metabolitů ellipticinu (9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu). Rozdíl v oxidaci ellipticinu katalyzované cytochromem P450 1A2 exprimovaným v obou systémech byl naopak minimální. Při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 3A4 exprimovaným v prokaryotickém systému

byl pozorován nárůst tvorby 9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu oproti systému eukaryotickému. Uvedené údaje naznačují, že studované formy cytochromu P450 exprimované v systému prokaryotickém jsou efektivnější v oxidaci ellipticinu než cytochromy P450 exprimované v eukaryotickém systému. To platí především pro cytochrom P450 1A1.

NADPH:cytochrom P450 reductasa byla v prokaryotickém systému exprimována ve dvou hladinách. Jedná se o enzym MFO systému, který katalyzuje transport elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450 [41]. Byl tedy sledován vliv množství této reductasy na oxidaci ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 exprimovanými v prokaryotickém systému. Při srovnání efektivity cytochromů P450 exprimovaných v prokaryotickém systému v oxidaci ellipticinu byla potencována aktivita cytochromů P450 1A1/2 i 3A4 exprimovaných v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy v tvorbě metabolitů než za nižší hladiny reductasy. Při oxidaci ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 1A exprimovanými v prokaryotickém systému bylo zachováno poměrné množství všech vzniklých metabolitů ellipticinu. Cytochrom P450 3A4 exprimovaný v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reductasy nejvíce potencoval tvorbu 13-hydroxyellipticinu (M3), z něhož se spontánním štěpením vzniklý karbeniový ion, ellipticin-13-ylum, váže na deoxyguanosin v DNA za tvorby majoritního aduktu [54]. Z výše uvedeného vyplývá vyšší efektivita v oxidaci ellipticinu všemi sledovanými cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou reductasy.

Dále byl sledován vliv cytochromu b_5 na metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 exprimovanými v eukaryotickém i prokaryotickém systému. Cytochrom b_5 , fakultativní složka systému MFO [59], ovlivňuje přenos elektronů řady oxidačních reakcí katalyzovaných cytochromy P450 [42]. Množství i poměrné zastoupení metabolitů ellipticinu je za přítomnosti cytochromu b_5 odlišné. Přítomností cytochromu b_5 byla schopnost cytochromů P450 podrodiny 1A exprimovaných v obou systémech oxidovat ellipticin snížena. Stimulační vliv cytochromu b_5 na katalýzu ellipticinu cytochromem P450 3A4 exprimovaným v obou systémech spočíval v nárůstu tvorby 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3), tedy metabolitů zodpovědných za tvorbu kovalentních aduktů s DNA vazbou s deoxyguanosinem [56]. Výše uvedené údaje potvrzují, že cytochrom b_5 moduluje aktivitu všech tří izoenzymů cytochromu P450 exprimovaných v obou systémech v oxidaci ellipticinu.

6 ZÁVĚR

Z výsledků předkládané bakalářské práce vyplývá, že stanovené cíle byly splněny. Získány byly následující výsledky:

Lidský cytochrom P450 3A4 exprimovaný v eukaryotickém i prokaryotickém systému katalyzuje oxidaci ellipticinu na pět metabolitů: 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5). Při oxidaci ellipticinu cytochromem P450 1A1 exprimovaným v obou systémech nevzniká 13-hydroxyellipticin (M3). 7-hydroxyellipticin (M4) není tvořen oxidací ellipticinu cytochromem P450 1A2 exprimovaným v obou systémech.

Při katalýze cytochromem P450 1A1 exprimovaným v prokaryotickém systému je patrný nárůst tvorby 9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2) a 7-hydroxyellipticinu (M4) oproti systému eukaryotickému. Rozdíl v produkci metabolitů ellipticinu katalyzované cytochromem P450 1A2 exprimovaným v obou systémech je minimální. Tvorba 9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3) je vyšší za katalýzy cytochromem P450 3A4 exprimovaným v prokaryotickém systému. Produkce všech metabolitů ellipticinu je vyšší při katalýze cytochromy P450 exprimovanými v prokaryotickém systému s vyšší hladinou NADPH:cytochrom P450 reduktasy než oxidací cytochromy P450 s nižší hladinou reduktasy.

Cytochrom b₅ moduluje oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450 1A1/2 a 3A4 exprimovanými v eukaryotickém i prokaryotickém systému. Za přítomnosti cytochromu b₅ katalyzují všechny tři izoenzymy cytochromu P450 exprimované v obou systémech přeměnu ellipticinu na pět metabolitů: 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3), 7-hydroxyellipticin (M4) a N²-oxid ellipticinu (M5).

Za přítomnosti cytochromu b₅ v reakčním systému obsahujícím cytochrom P450 1A1 exprimovaný v eukaryotickém i prokaryotickém systému dochází k tvorbě 13-hydroxyellipticinu (M3). Tvorba 7-hydroxyellipticinu (M4) je naopak snížena. V případě systému s cytochromem P450 1A2 cytochrom b₅ způsobuje změnu katalytické účinnosti vedoucí v obou systémech k nárůstu tvorby 7-hydroxyellipticinu (M4) a poklesu produkce ostatních metabolitů ellipticinu: 9-hydroxyellipticinu (M1), 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3). Funkce cytochromu P450 3A4 exprimovaného v obou systémech je vlivem cytochromu b₅ provázána zvýšenou tvorbou 12-hydroxyellipticinu (M2) a 13-hydroxyellipticinu (M3).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. *Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-101* [online]. Lyon: IARC, 2011. [cit. 2011-05-05]. Dostupné na WWW: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>.
2. ANZENBACHER, P. A.; ANZENBACHEROVÁ, E.: *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737 (2001).
3. ANZENBACHER, P.; DAWSON, J. H.; KITAGAWA, T.: *J. Mol. Struct.* **274**, 149 (1989).
4. AUCLAIR, C.: *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 1 (1987).
5. BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; FREI, E.; STIBOROVÁ, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **69**, 603 (2004).
6. BŘEZINOVÁ, A.: *Oxidace ellipticinu cytochromy P450 a její ovlivňování cytochromem b₅*. Diplomová práce, PŘF UK, Praha (2005).
7. DEMARINI, D. M.; ABU-SHAKRA, A.; GUPTA, R.; HENDEE, L. J.; LEVINE, J. G.: *Environ. Mol. Mutagen.* **20**, 12 (1992).
8. DIENSTBIER, Z.: *Kdy je rakovina léčitelná?* Praha: Grada (2003).
9. FREI, E.; BIELER, C. A.; ARLT, V. M.; WIESSLER, M.; STIBOROVÁ, M.: *Biochem. Pharmacol.* **64**, 289 (2002).
10. FROELICH-AMMON, S. J.; PATCHAN, M. W., OSHEROFF, N.; THOPSON, R. B.: *J. Biol. Chem.* **270**, 14998 (1995).
11. GARFINKEL, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493 (1958).
12. GOODWIN, S.; SMITH, A. F.; HORNING, E. C.: *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1903 (1959).
13. GUT, I.; SOUČEK, P.; HODEK, P.: *Pracovní lékařství* **1**, 15 (1992).
14. HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C.: *Cancer Res.* **58**, 4028 (1998).
15. CHROMÁ, L.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T.; MARTÍNEK, V.; STIBOROVÁ, M.: *Chem. Listy* **95**, 212 (2001).
16. IM, S. Ch.; WASKELL, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 144 (2011).
17. JURET, P.; TANGUY, A.; GIRARD, A.; LE TALAER, J. Y.; ABBATUCCI, J. S.; DAT-XUONG, N.; LE PECQ, J. B.; PAOLETTI, C.: *Nouv. Presse Med.* **8**, 1495 (1979).
18. KLENER, P.: *Chemoterapie - minimum pro praxi* Praha: Triton (1999).
19. KLINGENBERG, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376 (1958).
20. LU, G.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, G.; DWIVEDI, U.; CAMPBELL, W.: *J. Mol. Biol.* **248**, 931 (1995).

21. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; ZIEGLER, A.; BIEGER, D.: *Barevný atlas farmakologie, druhé přepracované a doplnění vydání* Praha: Grada (2001).
22. MARTÍNKOVÁ, E.; DONTENWILL, M.; FREI, E.; STIBOROVÁ, M.: *Neuro Endocrinol. Lett.* **30**, 60 (2009).
23. MARTÍNKOVÁ, J.; CHLÁDEK, J.; MIČUDA, S.; CHLÁDKOVÁ, J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů* Praha: Grada (2007).
24. MATHE, G.; TRIANA, K.; PONTIGGIA, P.; BLANQUET, D.; HALLARD, M.; MORETTE, C.: *Biomed. Pharmacother.* **52**, 391 (1998).
25. MATHEWS, F. S.: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **45**, 1 (1985).
26. MRÁZOVÁ, B.: *Modulace metabolické aktivace ellipticinu složkami monooxygenasového systému*. Doktorská disertační práce, PŘF UK, Praha (2010).
27. NEBERT, D. W.; NELSON, D. R.; FEYEREISEN, R.: *Xenobiotica* **19**, 1149 (1989).
28. NELSON, D. R. ; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J. J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D. J.; WATERMAN, M. R.; GOTOH, O.; COON, M. J.; ESTABROOK, R. W.; GUNSALUS, I. C.; NEBERT, D. W.: *Pharmacogenetics* **6**, 1 (1996).
29. NELSON, D. R.: *Cytochrome P450s in humans* [online]. [cit. 2011-04-30]. Dostupné na WWW: <<http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf>>.
30. *Novotvary 2007* [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2010. s. 21 - 31 [cit. 2011-04-22]. Dostupné na WWW: <<http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2007>>.
31. OHASHI, M.; SUGIKAWA, E.; NAKANISHI, N.: *Jpn J. Cancer Res.* **86**, 819 (1995).
32. *Ochrosia* [online]. lookfordiagnosis.com, 2009 [cit. 2011-04-24]. Dostupné na WWW: <<http://www.lookfordiagnosis.com/images.php?term=Ochrosia&lang=6>>.
33. OMURA, T.; SATO, R.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2370 (1964).
34. PAOLETTI, C.; LE PECQ, J. B.; DAT-XUONG, N.; JURET, P.; GARNIER, H.; AMIEL, J. L.; ROUESSE, J.: *Resent Results Cancer Res.* **74**, 107 (1980).
35. PETERA, J.; BLÁHA, V.; ČERVINKA, M.; DOLEŽEL, M.; DVOŘÁK, J.; ELIÁŠ, P.; FILIP, S.; GERYK, E.; JANDÍK, P.; JÍLKOVÁ, V.; MELICHAR, B.; ODRÁŽKA, K.; PAPIK, Z.; RYŠKA, A.; SVOBODA, V.; VIŽĎA, J.; VOŠMIK, M.; ZOUL, Z.: *Obecná onkologie* Praha: Karolinum (2005).
36. PETRUŽELKA, L.; KONOPÁSEK, B.; ASCHERMANNOVÁ, A.; HELMICOVÁ, E.; JANKŮ, F.; KLEIBL, Z.; MALIŠ, J.; MAREŠ, P.; NOVOTNÝ, J.; PŘIBYLOVÁ, O.; ŠPIČKA, I.; TESAŘOVÁ, P.: *Klinická onkologie* Praha: Karolinum (2003).

37. POLJAKOVÁ, J.; ECKSCHLAGER, T.; HRABĚTA, J.; HŘEBAČKOVÁ, J.; SMUTNÝ, S.; FREI, E.; MARTÍNEK, V.; KIZEK, R.; STIBOROVÁ, M.: *Biochem. Pharmacol.* 77, 1466 (2009).
38. POLJAKOVÁ, J.; FREI, E.; GOMEZ, J. E.; AIMOVÁ, D.; ECKSCHLAGER, T.; HRABĚTA, J.; STIBOROVÁ, M.: *Cancer Lett.* 252, 270 (2007).
39. REID, T. M.; MORTON, K. C.; WANG, C. Y.; KING, C. M.: *Environ. Mutagen.* 6, 705 (1984).
40. ROUESSE, J. G.; LE CHEVALIER, T.; CAILLE, F.; MONDESIR, J. M.; SANCHO-GAMIER, H.; MAY-LEVIN, F.; SPIELMAN, M.; DEJAGER, R.; AMIEL, J. L.: *Cancer Treat. Rep.* 69, 707 (1985).
41. SCHACTER, B. A.; NELSON, E. B.; MARVER, H. S.; MASTERS, B. S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972).
42. SCHENKMAN, J. B.; JANSSON, I.: *Pharmacol. Ther.* 97, 139 (2003).
43. SCHWALER, M. A.; ALLARD, B.; LESCOT, E.; MOREAU, F.: *J. Biol. Chem.* 270, 22709 (1995).
44. SINGH, M. P.; HILL, G. C.; PEOC'H, D.; RAYNER, B.; IMBACH, J. L.; LOWN, J. W.: *Biochemistry* 33, 10271 (1994).
45. STIBOROVÁ, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismů působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace* [online]. [cit. 2011-04-28]. Dostupné na WWW: <<http://oclanky.moachem.cz/soubory/adresar/001.pdf>>.
46. STIBOROVÁ, M.; ARLT, V. M.; HENDERSON, C. J.; WOLF, C. R.; KOTRBOVÁ, V.; MOSEROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PHILLIPS, D. H.; FREI, E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 318 (2007).
47. STIBOROVÁ, M.; BIELER, C. A.; WIESSLER, M.; FREI, E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001).
48. STIBOROVÁ, M.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; AIMOVÁ, D.; KOTRBOVÁ, V.; KUKAČKOVÁ, K.; JANOUCHOVÁ, K.; RUPERTOVÁ, M.; RYŠLAVÁ, H.; HUDEČEK, J.; FREI, E.: *Gen. Physiol. Biophys.* 25, 245-261 (2006).
49. STIBOROVÁ, M.; BREUER, A.; AIMOVÁ, D.; STIBOROVÁ-RUPERTOVÁ, M.; WIESSLER, M.; FREI, E.: *Int. J. Cancer* 107, 885 (2003).
50. STIBOROVÁ, M.; FREI, E.: *Chem. Listy* 95, 549 (2001).
51. STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; HODEK, P.; FREI, E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999).

52. STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PÁCA JR., J.; MARTÍNEK, V.; PÁCA, J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004).
53. STIBOROVÁ, M.; MIKŠANOVÁ, M.: *Živa* 4, 146 (1999).
54. STIBOROVÁ, M.; RUPERTOVÁ, M.; SCHMEISER, H. H.; FREI, E.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech Repub.* 150, 13 (2006).
55. STIBOROVÁ, M.; RUPERTOVÁ, M.; FREI, E.: *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 175 (2011).
56. STIBOROVÁ, M.; SEJBAL, J.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; AIMOVÁ, D.; POLJAKOVÁ, J.; FORSTEROVÁ, K.; RUPERTOVÁ, M.; WIESNER, J.; HUDEČEK, J.; WIESSLER, M.; FREI, E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004).
57. STIBOROVÁ, M.; STIBOROVÁ-RUPERTOVÁ, M.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; WIESSLER, M.; FREI, E.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 38 (2003).
58. STRATIL, P.; KUBÁŇ, V.: *Chem. Listy* 98, 379 (2004).
59. VON JAGOW, G.; SEBALD, W.: *Annu. Rev. Biochem.* 49, 281 (1980).
60. VORLÍČEK, J.; ABRAHÁMOVÁ, J.; VORLÍČKOVÁ, H.; ADAM, Z.; COUFAL, O.; DOUBEK, M.; KALVODOVÁ, L.; KOCMANOVÁ, I.; NAVRÁTIL, M.; POUR, L.; RÁČIL, Z.; SKŘIČKOVÁ, J.; SLÁMA, O.: *Klinická onkologie pro sestry* Praha: Grada (2006).
61. VRÁNOVÁ, I.: *Studium potenciace farmakologického účinku ellipticinu*. Bakalářská práce, PřF UK, Praha (2010).
62. WANG, M.; ROBERTS, L. D.; PASCHKE, R.; SHEA, M. T.; MASTERS, S. S. B.; KIM, P. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8411 (1997).

Souhlas s použitím práce

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.